

陈切希,简志青,贾冬英,等. 地衣芽孢杆菌 B-1 和鞘氨醇单胞菌 SC-1 原生质体制备与再生条件的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):36-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.009

地衣芽孢杆菌 B-1 和鞘氨醇单胞菌 SC-1 原生质体制备与再生条件的研究

陈切希¹, 简志青², 贾冬英¹, 迟原龙¹, 姚开¹

(1. 四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065; 2. 元智大学生物工程与科技研究所, 台湾桃园 32003)

摘要:以地衣芽孢杆菌 B-1 和鞘氨醇单胞菌 SC-1 为出发菌株,研究了其原生质体制备和再生的影响因素,为利用原生质体融合技术选育 β -氯氰菊酯高效降解菌奠定了基础。结果表明,菌株 B-1 原生质体制备的适宜条件为:菌龄 13 h,溶菌酶浓度 0.1 mg/mL,溶菌酶作用时间 15 min,原生质体形成率为 93.11%,再生率为 7.22%;菌株 SC-1 原生质体制备的适宜条件为:菌龄 12 h,EDTA 浓度 5 mmol/L,溶菌酶浓度 3.33 mg/mL,溶菌酶作用时间 15 min,原生质体形成率为 95.37%,再生率为 27.04%。

关键词:地衣芽孢杆菌;鞘氨醇单胞菌;原生质体;制备;再生;适宜条件; β -氯氰菊酯

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0036-04

近年来,随着人类对农产品的需求量不断增大,农药的使用量也呈不断上升趋势,然而长期使用造成了农畜产品和土壤中农药的残留量超标。 β -氯氰菊酯是一种重要的拟除虫菊酯类农药,广泛施用可能导致环境中残留量超标,直接或间接对人类健康造成威胁^[1-2]。微生物降解法具有安全、环保、无二次污染等特点被广泛应用于农产品以及土壤中农药的降解。目前,具有转化效率高的微生物已被应用于环境或农作物土壤中残留农药的降解^[3],然而多数菌株只能将 β -氯氰菊酯(β -CY)降解为 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)^[4]。原生质体融合技术是工业上微生物育种的一种重要手段,可以在种间、属间以及跨界融合^[5]。原生质体制备和再生是其融合过程非常关键的环节,直接决定育种的效率^[6]。笔者所在实验室前期从污染土壤中分离到地衣芽孢杆菌 B-1 和鞘氨醇单胞菌 SC-1,前者可以将 β -CY 降解为 3-PBA,后者可以将 3-PBA 继续降解^[7]。吴双研究表明,制备的菌株 B-1 和菌株 SC-1 可湿性粉剂可以修复 β -CY 污染的土壤,有效降低小白菜中 β -CY 残留^[8]。本研究探讨了地衣芽孢杆菌 B-1 和鞘氨醇单胞菌 SC-1 的原生质体制备和再生条件,以期通过原生质体融合技术选育 β -CY 和 3-PBA 高效降解菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

地衣芽孢杆菌 B-1 (*Bacillus licheniformis* B-1) 为实验室前期从茶园土壤分离驯化并保存的菌种,适宜条件下对 β -CY 降解率为 94.12%。鞘氨醇单胞菌 SC-1

(*Sphingomonas* sp. SC-1) 为笔者所在实验室前期从农药厂排污渠下游土壤中分离并保存的菌种,可以矿化降解 3-PBA。

β -CY 原药(含量 96.8%,荣城化工公司),3-PBA 标准品(纯度 > 98%,梯希爱化成工业有限公司),溶菌酶(100 000 U/mg, Sigma 公司),酸水解酪蛋白、胰蛋白胨、酵母膏、琼脂(BD 公司),蔗糖、葡萄糖、顺丁烯二酸、琥珀酸钠、甘露醇、青霉素、甘氨酸、BSA(Sigma 公司),其他试剂均为国产分析纯。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母膏 5.0 g,NaCl 10 g,去离子水 1 000 mL,pH 值 7.0,吐温 80 2.0 mL,121 °C 灭菌 20 min;LB 琼脂培养基:LB 培养基中加入琼脂 18 g 和定量 β -CY 或 3-PBA 工作液,使其浓度为 100 mg/L,121 °C 灭菌 20 min;再生培养基 DM3:参照文献[9]制备,用于菌株 B-1 原生质体的再生;再生培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母膏 5.0 g,NaCl 10 g,蔗糖 171 g,去离子水 1 000 mL,pH 值 7.0,吐温 80 2.0 mL,121 °C 灭菌 20 min,用于菌株 SC-1 原生质体再生;原生质体稳定液(SMM):0.5 mol/L 蔗糖,0.02 mol/L $MgCl_2$,0.02 mol/L 顺丁烯二酸,pH 值 6.5,121 °C 灭菌 20 min;Tris-HCl 缓冲液:Tris-HCl 0.01 mol/L,pH 值 8.0,121 °C 灭菌 20 min;EDTA 溶液:EDTA 0.1 mol/L,用 KOH 溶液调 pH 值至 8.0,121 °C 灭菌 20 min;溶菌酶液:用 SMM 溶液分别配制溶菌酶浓度为 2.0 mg/mL 和 10 mg/mL 溶液,0.22 μm 膜过滤除菌,-20 °C 保存备用。

SP-830 PLUS 可见分光光度计(Metertech 公司),UB-10 精密酸度计(Denver 公司),Axiostar Plus 光学显微镜(Zeiss 公司),CF16RXII 高速冷冻离心机(Hitachi 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株 B-1 和菌株 SC-1 生长曲线绘制 将菌株 B-1 和菌株 SC-1 分别划线接种于 β -CY 或 3-PBA 浓度为 100 mg/L 的 LB 琼脂斜面培养基上,30 °C 培养 48 h,无菌生理盐水洗下菌苔,混匀,按 5.0% 体积比例接入 β -CY 或

收稿日期:2017-11-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31371775)。

作者简介:陈切希(1993—),女,湖北襄阳人,硕士研究生,研究方向为食品安全。E-mail:397708645@qq.com。

通信作者:姚开,博士,教授,博士生导师,主要从事微生物农药降解研究。E-mail:yaokai555@126.com。

3-PBA 浓度为 100 mg/L 的 LB 培养基, 30 ℃ 振荡 (180 r/min) 培养 24 h, 每隔 2 h 取样, 测其吸光度 $D_{600\text{ nm}}$, 以培养时间对 $D_{600\text{ nm}}$ 作图。

1.2.2 菌株 B-1 原生质体的制备和再生 按 5.0% 的体积比例将菌株 B-1 接入 β -CY 浓度为 100 mg/L 的 LB 培养基中, 30 ℃ 振荡 (180 r/min) 培养至对数生长期。SMM 洗涤菌体 2 次, 离心 (4 ℃, 8 000 r/min) 10 min, SMM 重悬并调其 $D_{600\text{ nm}}$ 为 1.2, 取少量适当稀释后涂布于 LB 平板, 30 ℃ 培养 24~48 h, 菌落数记为 A; 余下的菌悬液中加入不同浓度的溶菌酶液, 37 ℃ 振荡 (100 r/min) 30 min, 离心 (4 ℃, 4 000 r/min) 10 min, 沉淀重悬于 SMM, 涂布于 LB 琼脂培养基和再生培养基 DM3, 30 ℃ 培养 24~48 h, 菌落数分别记为 B (未被除壁的菌体细胞) 和 C (再生菌体细胞), 按下式计算菌株 B-1 原生质体的形成率和再生率^[10]:

形成率 = $(A - B) / A \times 100\%$;

再生率 = $(C - B) / (A - B) \times 100\%$ 。

1.2.3 菌株 SC-1 原生质体的制备和再生 按 5.0% 的体积比例将菌株 SC-1 接种于 3-PBA 浓度为 100 mg/L 的 LB 培养基, 30 ℃ 振荡 (180 r/min) 培养至对数生长期。Tris-HCl 缓冲液洗涤菌体 2 次, 离心 (4 ℃, 12 000 r/min) 10 min, Tris-HCl 缓冲液重悬并调 $D_{600\text{ nm}}$ 为 1.4, 加入 EDTA 溶液, 使其终浓度为 10 mmol/L, 37 ℃ 振荡 (100 r/min) 20 min。SMM 洗涤菌体 2 次, 重悬于 SMM, 加入溶菌酶溶液, 37 ℃ 振荡 (100 r/min) 15 min, 离心 (4 ℃, 4 000 r/min) 10 min, 沉淀重悬于 SMM^[11,12]。SMM 梯度稀释, 涂布于再生培养基, 30 ℃ 培养 96~120 h。菌株 SC-1 原生质体的形成率和再生率计算方法同“1.3.2”节。

1.2.4 影响菌株原生质体形成和再生的因素

1.2.4.1 甘氨酸和青霉素对原生质体形成和再生的影响 分别在菌株 B-1 和菌株 SC-1 生长延滞期加入甘氨酸 (终浓度为 1.0 mg/mL) 或在生长对数中期加入青霉素 (终浓度为 2.5 U/mL), 测定并计算原生质体的形成率和再生率。

1.2.4.2 溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响 当菌株 B-1 生长至对数末期时 (13 h), 分别用不同浓度的溶菌酶作用 15 min; 当菌株 SC-1 生长至对数末期 (12 h) 时, EDTA 预处理, 分别用不同浓度的溶菌酶作用 20 min; 测定并计算原生质体的形成率和再生率。

1.2.4.3 溶菌酶作用时间对原生质体形成和再生的影响 用溶菌酶分别对菌株 B-1 和菌株 SC-1 作用不同时间, 测定原生质体的形成率和再生率。

1.2.4.4 EDTA 浓度对原生质体形成和再生的影响 分别用不同浓度的 EDTA 溶液对菌株 SC-1 进行预处理, 测定并计算原生质体形成率与再生率。

1.2.4.5 稳定剂对原生质体形成和再生的影响 考察相同浓度 (0.5 mol/L) 稳定剂 (琥珀酸钠、蔗糖、氯化钠、甘露醇) 的再生培养基分别对菌株 B-1 和菌株 SC-1 再生率的影响。

1.2.4.6 原生质体制备和再生适宜条件的确定 基于上述单因素试验结果, 对原生质体制备和再生的适宜条件进行试验确认。

1.3 数据处理

所有试验平行重复 3 次, 使用软件 Origin 9.0 和 Excel 2017 对试验数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 菌株 B-1 和菌株 SC-1 的生长曲线

菌株 B-1 和菌株 SC-1 的生长曲线如图 1 和图 2 所示。可以看出, 菌株 B-1 的延滞期为 8 h, 16 h 后进入稳定期; 菌株 SC-1 经过 2 h 的延滞期进入对数生长期, 18 h 后进入稳定期。对数期菌体的生理状态相对一致, 代谢旺盛, 对溶菌酶的敏感性强, 有利于原生质体形成和再生, 对数期末菌体数最多, 方便收集^[13], 因此菌株 B-1 和菌株 SC-1 菌龄分别是 13 h 和 12 h。

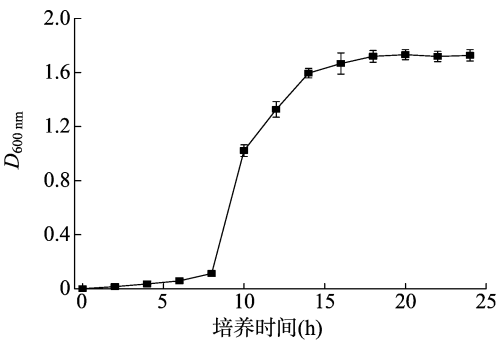


图1 菌株 B-1 的生长曲线

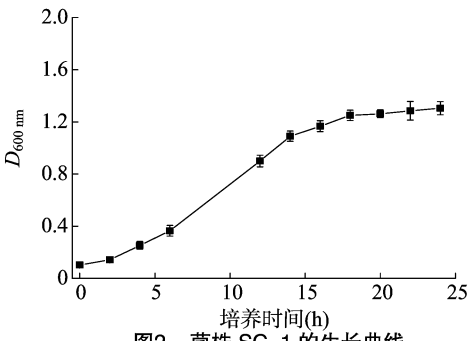


图2 菌株 SC-1 的生长曲线

2.2 影响原生质体形成和再生的因素

2.2.1 甘氨酸和青霉素对原生质体形成和再生的影响 甘氨酸是细菌细胞壁的结构类似物, 可能掺入细胞壁中, 扰乱肽聚糖的相互交联, 导致细胞壁结构的不完整, 不利于细胞的生长^[13]。青霉素可能与转肽酶结合, 抑制其侧链末端的丙氨酸与五肽桥的连接, 影响转肽作用与肽键的形成, 所以增强菌体对溶菌酶的敏感性, 有利于细胞原生质体的形成^[14]。表 1 结果表明, 2 个菌株的培养过程中分别加入甘氨酸或青霉素的

表 1 甘氨酸和青霉素对菌株原生质体形成和再生的影响

菌株	试剂	形成率 (%)	再生率 (%)
B-1	空白对照	87.6	5.31
	甘氨酸	100	1.98
	青霉素	100	0.78
SC-1	空白对照	77.81	17.14
	甘氨酸	100	0.21
	青霉素	100	0.12

原生质体形成率虽然略有提高,但是原生质体的再生率显著降低。

2.2.2 溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响 由图 3 可以看出,2 个菌株原生质体形成率均随溶菌酶浓度的增加而提高,而再生率呈下降趋势;当溶菌酶浓度为 0.1 mg/mL 时,菌株 B-1 的原生质体形成率(90%)和再生率(4.61%)较高;当溶菌酶浓度为 3.33 mg/mL 时,菌株 SC-1 的形成率(90.2%)和再生率(13.73%)较高;当酶浓度继续增加,2 个菌株的原生质体形成率提高不明显,但原生质体再生率显著下降。因为溶菌酶酶解细胞壁的原因是它可以破坏细胞壁肽

聚糖的 $\beta-1,4$ 糖苷键,浓度越高破坏效果越明显,易导致脱壁过度,使其失去再生细胞壁的引物^[13-14],所以当其浓度过高时,再生率显著降低。

2.2.3 溶菌酶作用时间对原生质体形成和再生的影响 由图 4 可以看出,初始阶段菌株 B-1 和菌株 SC-1 原生质体形成率随作用时间的延长迅速提高,15 min 后提高缓慢,而再生率随作用时间的延长而降低。溶菌酶作用时间短,原生质体表面的细胞壁碎片较多,可作为细胞壁再生的引物,但作用时间过长,菌体细胞壁碎片被全部酶解,而且原生质体容易受损,导致其再生困难^[15]。

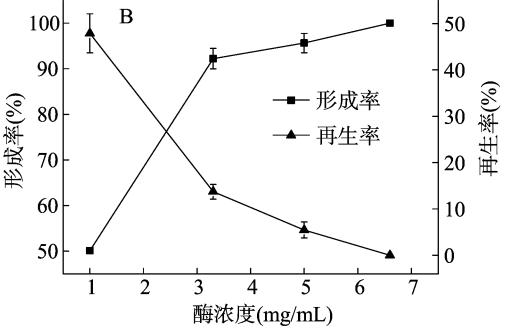
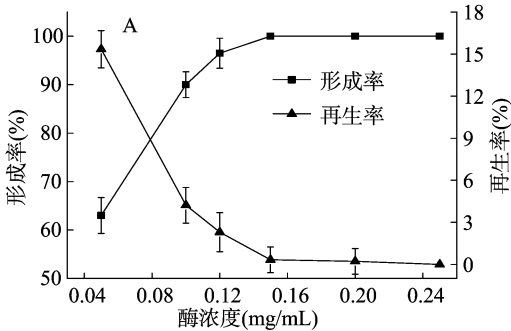


图3 溶菌酶浓度对菌株 B-1(A)和菌株 SC-1(B)原生质体形成和再生的影响

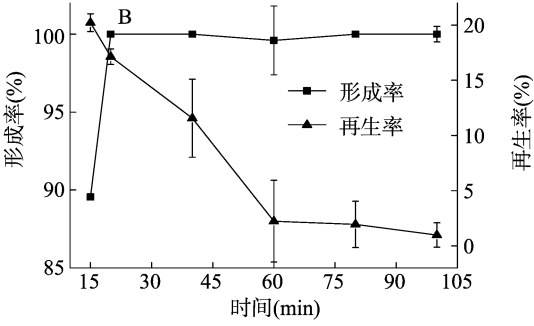
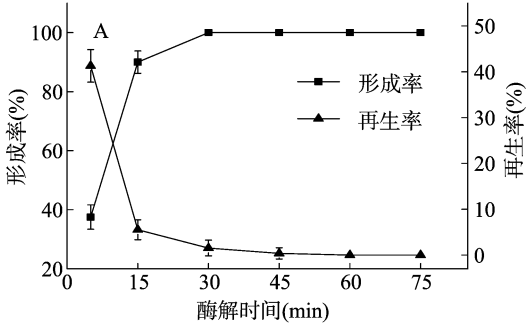


图4 溶菌酶作用时间对菌株B-1(A)和菌株SC-1(B)原生质体形成和再生的影响

2.2.4 EDTA 浓度对原生质体形成和再生的影响 由图 5 可以看出,随着 EDTA 浓度增加,菌株 SC-1 的原生质体形成率提高,而再生率呈现下降趋势。以原生质体形成率与再生率的乘积最大作为判断原生质体制备条件的依据^[16],EDTA 预处理的适宜浓度为 5 mmol/L。EDTA 对菌株 SC-1 进行预处理可明显提高原生质体的形成率,因为 EDTA 可以通过螯合作用破坏菌株 SC-1 细胞壁的外膜,有利于溶菌酶与肽聚糖的接触,提高原生质体的形成率,但是 EDTA 对原生质体具有毒害作用,随着作用时间延长,原生质体的再生率下降^[11]。

2.2.5 稳定剂对原生质体形成和再生的影响 由表 2 可以看出,琥珀酸钠是菌株 B-1 原生质体再生的较理想稳定剂,其再生率(6.82%)最高;蔗糖是菌株 SC-1 原生质体再生的较理想稳定剂,再生率(26.54%)最高。稳定剂一方面可以调节渗透压维持原生质体的稳定有利于再生,另一方面原生质体可能会利用稳定剂代谢产酸,导致再生培养基的 pH 值下降,不利于原生质体的再生,选择合适的稳定剂对原生质体的再生至关重要。

2.2.6 原生质体制备适宜条件的验证 基于单因素试验结果,确定菌株 B-1 原生质体制备的适宜条件为:菌龄 13 h,

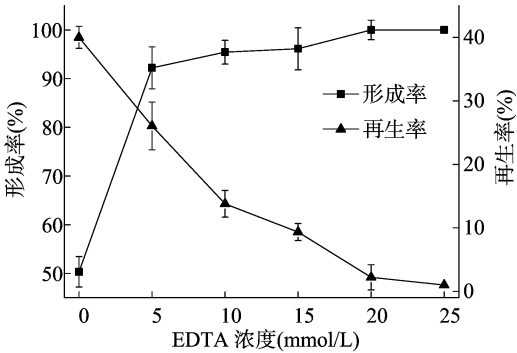


图5 EDTA浓度对菌株 SC-1 原生质体形成和再生的影响

表 2 稳定剂对菌株 B-1 和菌株 SC-1 原生质体再生的影响

稳定剂	再生率 (%)	
	菌株 B-1	菌株 SC-1
琥珀酸钠	6.82	11.3
蔗糖	3.77	26.54
氯化钠	2.5	0.48
甘露醇	3.68	3.13

溶菌酶浓度 0.1 mg/mL,溶菌酶作用时间 15 min;菌株 SC-1 原生质体制备的适宜条件为:菌龄 12 h, EDTA 浓度 5 mmol/L,溶菌酶浓度 3.33 mg/mL,溶菌酶作用时间 15 min。验证试验结果显示,菌株 B-1 原生质体形成率为 93.11%,

再生率为 7.22%;菌株 SC-1 原生质体形成率为 95.37%,再生率为 27.04%。2 个菌株原生质体制备前后的显微镜图像如图 6 和图 7 所示。可以看出,长杆状的菌株 B-1 细胞和短杆状的菌株 SC-1 细胞多数转变为球形。

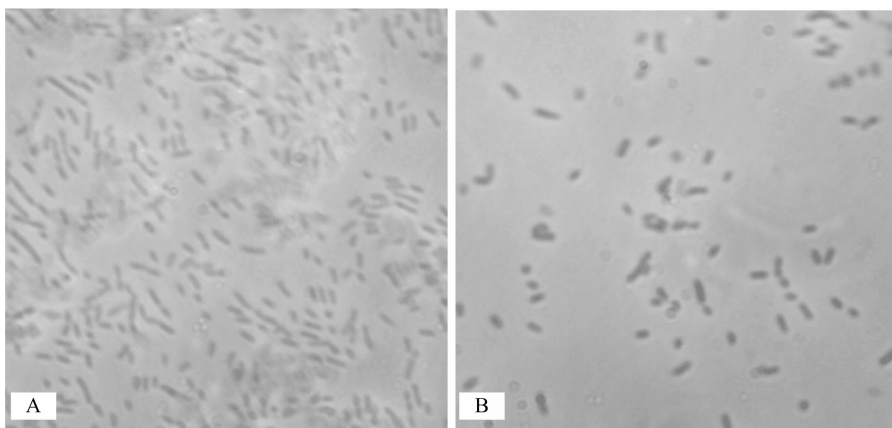


图6 菌株 B-1 细胞(A)和原生质体(B)(1 000×)

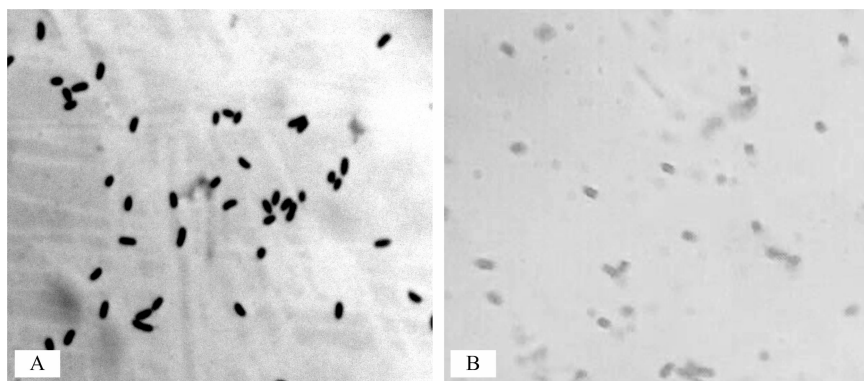


图7 菌株 SC-1 细胞(A)和原生质体(B)(1 000×)

3 结论

原生质体制备是原生质体融合的关键技术之一,要制备有活性且大量的原生质体,需要对不同菌株进行合适的处理。本研究对分离得到的地衣芽孢杆菌 B-1 和鞘氨醇单胞菌 SC-1 原生质体进行研究,发现菌龄、溶菌酶浓度及作用时间等因素对原生质体的形成和再生影响明显。本研究获得了具有活性的原生质体,适宜条件下菌株 B-1 和菌株 SC-1 的原生质体形成率和再生率均较高,为后续通过原生质体融合技术选育 β -CY 高效降解菌奠定了基础。

参考文献:

- [1] McKinlay R, Plant J A, Bell J N B, et al. Endocrine disrupting pesticides; implications for risk assessment [J]. *Environment International*, 2008, 34(2): 168-183.
- [2] Poonam S, Sumaya F, Rambir S. Neurotoxic effect of cypermethrin and protective role of resveratrol in Wistar rats [J]. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2014, 4(2): 104-111.
- [3] Singh B K. Organophorus - degrading bacteria; ecology and industrial

- applications [J]. *Nature Review Microbiology*, 2009, 7: 156-163.
- [4] McCoy M R, Yang Z, Fu X, et al. Monitoring of total type II pyrethroid pesticides in citrus oils and water by converting to a common product 3 - phenoxybenzoic acid [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(20): 5065-5070.
- [5] 崔俊涛, 张伟, 曹天舒. 阿特拉津降解融合子的原生质体制备及其筛选 [J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(6): 2269-2273.
- [6] 武朝霞. 嗜酸乳杆菌与地衣芽孢杆菌融合子制备及性能分析 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2013: 1-69.
- [7] Liu F, Chi Y, Wu S, et al. Simultaneous degradation of cypermethrin and its metabolite, 3 - phenoxybenzoic acid, by the cooperation of *Bacillus licheniformis* B-1 and *Sphingomonas* sp. SC-1 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(33): 8256-8262.
- [8] 吴双. 菌株协同降解 β -氯氰菊酯特性及可湿性粉剂的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2014.
- [9] Bianca W, Jens W, Susanne W, et al. Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78: 181-188.
- [10] 袁铸, 王忠彦, 胡承等. 地衣芽孢杆菌 JF-20 原生质体的形成及其再生的最佳条件 [J]. *四川大学学报 (自然科学版)*, 2001, 38(5): 723-727.

王海波,李璐,苏新国,等. *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):40-42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.010

MaCaM 和 *MaCAMTA3* 基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用

王海波¹, 李璐², 苏新国¹, 张昭其³, 庞学群²

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520; 2. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642;

3. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

摘要:为了探讨 *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用,将香蕉经 52 ℃ 热水处理 3 min 后于 7 ℃ 贮藏 5 d,测定脯氨酸含量,利用实时荧光定量 PCR 分析 *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在香蕉热处理和低温贮藏中的表达情况。结果表明,香蕉果实经热激处理后在 7 ℃ 贮藏时,其脯氨酸含量一直明显高于对照处理。7 ℃ 低温诱导香蕉果实的 *MaCaM* 基因表达在 1 h 迅速升高至最大值,之后又在 4 h 迅速下降,后期维持在一个较低的水平。而经热激处理后在 7 ℃ 贮藏的香蕉果实,其 *MaCaM* 基因表达高峰推迟出现在 4 h,除 7 ℃ 贮藏 1、4 h 外,热激处理的 *MaCaM* 基因表达均高于对照。热处理能诱导香蕉果实 *MaCAMTA3* 基因表达在处理 3 h 内迅速增强,7 ℃ 贮藏下 *MaCAMTA3* 基因表达呈现先下降后上升再下降的趋势,而经过热激处理后在 7 ℃ 贮藏的香蕉果实,除 7 ℃ 贮藏 1、4 h 外,其 *MaCAMTA3* 基因表达均高于对照。*MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因表达增强可能参与了热处理诱导香蕉果实产生的抗冷性。

关键词:香蕉; *MaCaM*; *MaCAMTA3*; 热处理; 脯氨酸; 抗冷性

中图分类号: TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0040-03

香蕉果实在贮藏温度低于 12 ℃ 时即发生冷害,难以采用较低的温度来延长贮运期^[1-2]。热处理是提高果蔬抗冷性的最有效的采后处理措施之一^[3],但热处理诱导的抗冷机制目前尚不明确。钙调素(calmodulin, CaM)是植物中重要的第二信使, CAMTA(calmodulin-binding transcription activator)/SR(signal responsive transcription activator)是一类广泛存在于真核生物中的含有 CaM 结合位点的转录因子家族。CaM 和 CAMTA 在植物响应逆境中起调节作用,对香蕉 CaM 和 CAMTA 的深入研究,有助于进一步了解香蕉钙信号系统调节的分子机制,有助于揭示热处理提高香蕉果实抗冷性的作用

机理。CaM 参与了植物对高温、低温胁迫等的响应,并且在植物细胞对胁迫的适应过程中起重要调节作用^[4-5]。热、冷、干旱等多种胁迫都能诱导 CAMTA 基因上调表达^[6-7]。拟南芥 CAMTA3 能同 CBF2(C-repeat binding transcription factor)启动子区域 CM2 序列(CCGCGT)结合,激活 CBF2 等基因的表达,从而提高拟南芥的抗冷性^[8]。笔者所在课题组的前期研究结果表明,采用 52 ℃ 热水处理香蕉果实 3 min,能有效减轻香蕉果实的冷害症状^[9-10],但有关 CaM 和 CAMTA 在热水处理诱导香蕉抗冷性中的作用目前还不明确。分析 CaM 和 CAMTA 基因在香蕉热处理和低温贮藏中的表达情况,探讨这 2 个基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用,为有效延长香蕉贮运期提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

香蕉品种为巴西(*Musa* spp. AAA Group cv. cavendish),采自广东省广州市番禺香蕉园,及时运回广东省果蔬保鲜重点实验室。挑选七成饱满、大小均匀、无病虫害及机械损伤的单个香蕉,先后用 0.1% 漂白粉和 0.05% 咪鲜胺锰盐可湿性

收稿日期:2017-06-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301584);广东省自然科学基金(编号:S2013010013987);广东省高校优秀青年教师项目(2014);广东省科技计划(编号:2012A020100007);广东省广州市科技计划(编号:20180401491)。

作者简介:王海波(1981—),男,湖南祁阳人,博士,教授,主要从事果蔬保鲜技术研究。Tel:(020)29164658;E-mail:haibovip@126.com。通信作者:庞学群,博士,教授,主要从事果蔬保鲜技术研究。Tel:(020)85280195;E-mail:xqpang@scau.edu.cn。

[11] Dai M, Ziesman S, Ratcliffe T, et al. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2005, 7(1): 45-52.

[12] 周明明,李晓雁,陈悦,等. 鞘氨醇单胞菌 TP-3 原生质体制备与再生的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 22: 184-188.

[13] 周东坡,平文祥. 微生物原生质体融合与基因重排[M]. 北京:

中国科学技术出版社, 2010: 1-421.

[14] 余波,吕向云,董凤晴,等. 凝结芽孢杆菌原生质体的制备、再生及灭活[J]. 食品科技, 2017, 42(4): 2-7.

[15] 李森,曾柏全,冯金儒. 高产纤维素酶菌株原生质体制备及再生条件[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(12): 174-180.

[16] 周颀. 基于基因组重排技术筛选角蛋白酶高产菌株及发酵动力学研究[D]. 成都:四川大学, 2016.